



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 19 846 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 198 19 846.9
⑳ Anmeldetag: 5. 5. 98
㉑ Offenlegungstag: 11. 11. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 K 16/00
A 61 K 39/395
C 12 N 15/63
// G 01 N 33/569,
33/574

DE 198 19 846 A 1

⑦① Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:
Little, Melvyn, 69151 Neckargemünd, DE;
Kipriyanov, Sergej, 69121 Heidelberg, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:
WO 91 19 739
CA 119:157915a;
CA 126:130370a;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Multivalente Antikörper-Konstrukte

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind. Ferner betrifft die Erfindung Expressionsplasmide, die für ein solches F_v-Antikörper-Konstrukt codieren, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie deren Verwendung.

DE 198 19 846 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft multivalente F_v-Antikörper-Konstrukte, die kodierende Expressionsplasmide, und ein Verfahren zur Herstellung der F_v-Antikörper-Konstrukte sowie ihre Verwendung.

Natürliche Antikörper sind Dimere und werden daher als bivalent bezeichnet. Sie weisen vier variable Domänen, nämlich zwei V_H- und zwei V_L-Domänen, auf. Die variablen Domänen dienen als Bindungsstellen für ein Antigen, wobei eine Bindungsstelle aus einer V_H- und einer V_L-Domäne ausgebildet ist. Natürliche Antikörper erkennen jeweils ein Antigen, wodurch sie auch als monospezifisch bezeichnet werden. Ferner weisen sie auch konstante Domänen auf. Diese tragen zur Stabilität der natürlichen Antikörper bei. Andererseits sind sie auch für unerwünschte Immunreaktionen mitverantwortlich, die entstehen, wenn natürliche Antikörper verschiedener Tierarten wechselseitig verabreicht werden.

Zur Vermeidung solcher Immunreaktionen werden Antikörper konstruiert, denen die konstanten Domänen fehlen. Insbesondere sind dies Antikörper, die nur noch die variablen Domänen aufweisen. Solche Antikörper werden mit F_v-Antikörper-Konstrukten bezeichnet. Diese liegen häufig in Form einzelkettiger, sich miteinander gepaarter Monomere vor.

Es hat sich allerdings gezeigt, daß F_v-Antikörper-Konstrukte nur eine geringe Stabilität aufweisen. Ihre Verwendbarkeit für therapeutische Zwecke ist daher stark eingeschränkt.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einen Antikörper bereitzustellen, mit dem unerwünschte Immunreaktionen vermieden werden können. Ferner soll er eine Stabilität aufweisen, die ihn für therapeutische Zwecke einsetzbar macht.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt, das eine große Stabilität aufweist. Ein solches eignet sich für diagnostische und therapeutische Zwecke.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß die Stabilität eines F_v-Antikörper-Konstruktes erhöht werden kann, wenn dieses in Form eines einzelkettigen Dimeres vorliegt, bei dem die vier variablen Domänen über drei Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ferner hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa 10–30 Aminosäuren aufweist. Des weiteren hat der Anmelder erkannt, daß sich das F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet, wenn der mittlere Peptidlinker eine Länge von etwa bis zu 10 Aminosäuren aufweist, wodurch ein multimeres, d. h. multivalentes, F_v-Antikörper-Konstrukt erhalten wird. Auch hat der Anmelder erkannt, daß das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch sein kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereitzustellen, das mindestens vier variable Domänen umfaßt, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.

Der Ausdruck "F_v-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen Antikörper hin, der variable Domänen, nicht aber konstante Domänen aufweist.

Der Ausdruck "multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt" weist auf einen F_v-Antikörper hin, der mehrere variable Domänen, jedoch mindestens vier aufweist. Solches wird erreicht, wenn sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt

mit sich selbst faltet, wodurch vier variable Domänen gegeben sind, oder sich mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. In letzterem Fall liegt ein F_v-Antikörper-Konstrukt vor, das 8, 12, 16, etc. variable Domänen aufweist. Günstig ist es, wenn das F_v-Antikörper-Konstrukt vier oder acht variable Domänen aufweist, d. h. es ist bi- oder tetravalent (vgl. Fig. 1). Ferner können die variablen Domänen gleich oder verschieden voneinander sein, wodurch das Antikörper-Konstrukt ein oder mehrere Antigene erkennt. Vorzugsweise erkennt das Antikörper-Konstrukt ein oder zwei Antigene, d. h. es ist mono- bzw. bispezifisch. Beispiele solcher Antigene sind die Proteine CD19 und CD3.

Der Ausdruck "Peptidlinker 1, 3" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Die Peptidlinker 1 und 3 können gleich oder verschieden voneinander sein. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 0–10 Aminosäuren aufweisen. In ersterem Fall ist der Peptidlinker lediglich eine Peptidbindung aus dem COOH-Rest einer der variablen Domänen und dem NH₂-Rest einer anderen der variablen Domänen. Vorzugsweise weist der Peptidlinker die Aminosäuresequenz GG auf.

Der Ausdruck "Peptidlinker 2" weist auf einen Peptidlinker hin, der geeignet ist, variable Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes miteinander zu verbinden. Der Peptidlinker kann jegliche Aminosäuren enthalten, wobei die Aminosäuren Glycin (G), Serin (S) und Prolin (P) bevorzugt sind. Ferner kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 3–10 Aminosäuren, insbesondere 5 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz GGPGS, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit anderen einzelkettigen F_v-Antikörper-Konstrukten zusammenfaltet. Des weiteren kann der Peptidlinker eine Länge von etwa 11–20 Aminosäuren, insbesondere 15–20 Aminosäuren, und ganz besonders die Aminosäuresequenz (G₄S)₄, aufweisen, wodurch erreicht wird, daß sich das einzelkettige F_v-Antikörper-Konstrukt mit sich selbst faltet.

Ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Günstig ist ein Verfahren, bei dem für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird. Es wird auf die Beispiele 1–5 verwiesen. Hinsichtlich der Ausdrücke "F_v-Antikörper-Konstrukt" und "Peptidlinker" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Ergänzend wird auf Maniatis, T. et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1982, verwiesen.

DNAs, die für ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt kodieren, sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Expressionsplasmide, die solche DNAs enthalten, auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Bevorzugte Expressionsplasmide sind pDISC3 × 19-LL, pDISC3 × 19-SL, pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellen) am 30. April 1998 unter DSM 12150, DSM 12149, DSM 12152 bzw. DSM 12151 hinterlegt.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit, umfassend:

- (a) ein erfindungsgemäßes F_v-Antikörper-Konstrukt, und/oder
- (b) ein erfindungsgemäßes Expressionsplasmid, sowie
- (c) übliche Hilfsstoffe, wie Puffer, Lösungsmittel und Kontrollen.

Von den einzelnen Komponenten können ein oder mehrere Vertreter vorliegen.

Die vorliegende Erfindung stellt ein multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt bereit, bei dem die variablen Domänen über Peptidlinker miteinander verbunden sind. Ein solches Antikörper-Konstrukt zeichnet sich dadurch aus, daß es keine Teile enthält, die zu unerwünschten Immunreaktionen führen können. Ferner weist es eine große Stabilität auf. Des weiteren ermöglicht es mehrere Antigene gleichzeitig zu binden. Das erfindungsgemäße F_v-Antikörper-Konstrukt eignet sich daher bestens nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke verwendet zu werden. Solche Zwecke können hinsichtlich jeder Erkrankung, insbesondere einer viralen, bakteriellen oder Tumorerkrankung, gesehen werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die genetische Organisation eines erfindungsgemäßen F_v-Antikörper-Konstruktes (A) und Schemata zur Bildung eines bivalenten (B) bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes (C). Ag: Antigen; His₆: sechs C-terminale Histidinreste; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 2 zeigt das Schema zur Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL. c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; His₆: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase (PelB-Leader); rbs: Ribosomenbindungsstelle; Stop: Stoppcodon (TAA); V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 3 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-LL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; bla: Gen, das für β-Lactamase kodiert, die für Ampicillinresistenz verantwortlich ist; bp: Basenpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid kodiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 2: Sequenz, die für ein (Gly₄Ser)₄-Polypeptid kodiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 4 zeigt ein Diagramm des Expressionsplasmids pDISC3 × 19-SL. 6 × His: Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste codiert; bla: Gen, das für βpaare; c-myc: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; ColE1: Origin der DNA-Replikation; f1-IG: intergenische Region des Bakteriophagen f1; Lac P/O: wt lac-Operon-Promotor/Operator; Linker 1: Sequenz, die für ein GlyGly-Dipeptid codiert, das die V_H- und V_L-Domänen verknüpft; Linker 3: Sequenz, die für ein GlyGly-ProGlySer-Oligopeptid codiert, das die hybriden scFv-Fragmente verknüpft; Pel-B-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; rbs: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 5 zeigt die Nukleotid- und die davon abgeleitete

Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-LL kodierten bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region; Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His₆-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 6 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz des durch das Expressionsplasmid pDISC3 × 19-SL kodierten tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes. c-myc-Epitop: Sequenz, kodierend für ein Epitop, das von dem Antikörper 9E10 erkannt wird; CDR: Komplementarität bestimmende Region, Gerüst: Gerüstregion (Framework-Region); His₆-Schwanz, Sequenz, die für sechs C-terminale Histidinreste kodiert; PelB-Leader: Signalpeptidsequenz der bakteriellen Pectatylase; RBS: Ribosomenbindungsstelle; V_H und V_L: variable Region der schweren und der leichten Kette.

Fig. 7 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Fig. 8 zeigt die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz einer Verbindung zwischen einem Gen, das für eine α-Faktor-Leadersequenz kodiert, und einem Gen, das für das bivalente F_v-Antikörper-Konstrukt codiert, in dem Pichia-Expressionsplasmid pPIC-DISC-LL. Alpha-Faktor-Signal: Leaderpeptidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae*-α-Faktor-Sekretionssignals; V_H: variable Region der schweren Kette. Rauten zeigen die Signalspaltstellen an.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Konstruktion der Plasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Bakterien

Die Plasmide pHOG-αCD19 und pHOG-dmOKT3, welche für die scFv-Fragmente codieren, die von dem Hybridom HD37, das für menschliches CD19 (Kipriyanov et al., 1996, J. Immunol. Meth. 196, 51–62) spezifisch ist, bzw. von dem Hybridom OKT3, das für menschliches CD3 (Kipriyanov et al., 1997, Protein Eng. 10, 445–453) spezifisch ist, abgeleitet sind, wurde zur Konstruktion von Expressionsplasmiden für ein einzelkettiges F_v-Antikörper-Konstrukt verwendet. Ein PCR-Fragment 1 der V_H-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für einen GlyGly-Linker codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP1, 5'-TCACACAGAAATCTTAGATCTATTAAAGAGAGAAAATTAACC, und DP2, 5'-AGCACACGATATCACCGCCAAGCTTGGGTGTTGTTTGGC, erzeugt (vgl. Fig. 2). Das PCR-Fragment 1 wurde mit EcoRI und EcoRV gespalten und mit dem mit EcoRI/EcoRV linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG19-3 erzeugt wurde. Das PCR-Fragment 2 der V_L-Domäne von Anti-CD19, gefolgt von einem Segment, das für ein c-myc-Epitop und einen Hexahistidinschwanz codiert, wurde unter Verwendung der Primer DP3, 5'-AGCA-

CACAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTACCCAAAC-TCCA, und DP4, 5'-AGCACACTCTAGAGACACACAGATCTTTAGTGATGGTGATGGTGATGTGAGTTTGG, erzeugt. Das PCR-Fragment 2 wurde mit HindIII und XbaI gespalten und mit dem durch HindIII/XbaI linearisierten Plasmid pHOG-dmOKT3 ligiert, wodurch der Vektor pHOG3-19 erhalten wurde (vgl. Fig. 2). Das für das hybride scFv-3-19 codierende Gen in dem Plasmid pHOG3-19 wurde mittels PCR mit den Primern Bi3sk, 5'-CAGCCGGCCATGGCGCAGGTGCAACTGCAGCAG und entweder Li-1, 5'-TATA-TACTGCAGCTGCACCTGGCTACCAACAC-CACCGGAGCCGCCACCACCGCTACCAACCGCCGCGGAGAACCAACCAACAGCGGCCGCGAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines langen flexiblen (Gly₄Ser)₄-inter-scFv-Linkers (PCR-Fragment 3, vgl. Fig. 2) oder Li-2, 5'-TATATACTGCAGCTGCACCTGGCGACCTGGGCCAC-CAGCGGCCGCGAGCATCAGCCCG, zur Erzeugung eines kurzen, starren GGPGS-Linkers (PCR-Fragment 4, vgl. Fig. 2) amplifiziert. Die Expressionsplasmide pDISC3 × 19-LL und pDISC3 × 19-SL wurden durch Ligierung des NcoI/PvuII-Restriktionsfragments aus pHOG 19-3, umfassend das Vektorgerüst und die NcoI/PvuII-gespaltenen PCR-Fragmente 3 bzw. 4 konstruiert (vgl. Fig. 3, 4). Die vollständige Nukleotid- und Proteinsequenzen der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte sind in den Fig. 5 bzw. 6 angegeben.

Beispiel 2

Konstruktion der Plasmide pPIC-DISC-LL und pPIC-DISC-SL zur Expression von bivalenten, bispezifischen bzw. tetravalenten, bispezifischen F_v-Antikörper-Konstrukten in Hefe

(A) Konstruktion von pPIC-DISC-SL

Der Vektor pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) zur Expression und Sekretion von rekombinanten Proteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurde als Ausgangsmaterial verwendet. Er enthält ein Gen, das für das *Saccharomyces cerevisiae* α-Faktor-Sekretionssignal codiert, gefolgt von einem Polylinker. Die Sekretion dieses Vektors beruht auf dem dominanten selektierbaren Marker, ZeocinTM, der sowohl in *Pichia* als auch in *E. coli* bifunktionell ist. Das Gen, das für das tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukt (scDia-SL) codiert, wurde mittels PCR von der Matrize pDISC3 × 19-SL unter Verwendung der Primer 5-PIC, 5'-CCGTGAATTCCAGGTGCAACTGCAG-CAGTCTGGGGCTGAACCTGGC, und pSEXBN 5'-GGTCGACGTTAACCAGACAAACAACAGATAAAACG amplifiziert. Das so erhaltene PCR-Produkt wurde mit EcoRI und XbaI gespalten und in mit EcoRI/XbaI linearisiertes pPICZαA ligiert. Es wurde das Expressionsplasmid pPIC-DISC-SL erhalten. Die Nukleotid- und Proteinsequenzen des tetravalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 7 gezeigt.

(B) Konstruktion von pPIC-DISC-LL

Die Konstruktion von pPIC-DISC-LL wurde auf der Grundlage von pPICZαA (Invitrogen BV, Leek, Niederlande) und pDISC3 × 19-LL (vgl. Fig. 3) durchgeführt. Die Plasmid-DNA pPICZαA wurde mit EcoRI gespalten. Die überstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung eines Klenow-Fragments der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt. Die so erhaltene DNA wurde mit XbaI gespalten, und das große Fragment, umfassend den pPIC-Vektor, wurde

isoliert. Analog wurde die DNA von pDISC3 × 19-LL mit NcoI gespalten und mit einem Klenow-Fragment behandelt. Nach der Spaltung mit XbaI wurde ein kleines Fragment, umfassend ein für den bivalenten F_v-Antikörper kodierendes Gen, isoliert. Dessen Ligierung mit einer pPIC-abgeleiteten Vektor-DNA ergab das Plasmid pPIC-DISC-LL. Die Nukleotid- und Proteinsequenz des bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 3

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten F^r-Antikörper-Konstruktes in Bakterien

E. coli-XL1-Blue-Zellen (Stratagene, La Jolla, CA), die mit den Expressionsplasmiden pDISC3 × 19-LL bzw. pDISC3 × 19-SL transformiert worden waren, wurden über Nacht in 2×YT-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 mM Glucose (2×YT_{GA}) bei 37°C gezüchtet. 1 : 50-Verdünnungen der Übernachtskulturen in 2×YT_{GA} wurden als Kolbenkulturen bei 37°C unter Schütteln mit 200 UpM gezüchtet. Als die Kulturen einen OD₆₀₀-Wert von 0,8 erreicht hatten, wurden die Bakterien durch 10minütige Zentrifugation mit 1500 g bei 20°C pelletiert und in dem gleichen Volumen eines frischen 2×YT-Mediums, das 50 µg/ml Ampicillin und 0,4 M Saccharose enthielt, resuspendiert. IPTG wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugesetzt, und das Wachstum wurde bei Raumtemperatur (20–22°C) 18–20 h fortgesetzt. Die Zellen wurden durch 10minütige Zentrifugation mit 5000 g bei 4°C geerntet. Der Kulturüberstand wurde zurückgehalten und auf Eis gelagert. Um die löslichen periplasmatischen Proteine zu isolieren, wurden die pelletierten Bakterien in 5% des Anfangsvolumens an eiskalter 50 mM Tris-HCl, 20% Saccharose, 1 mM EDTA, pH 8,0, resuspendiert. Nach einer 1 stündigen Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Rühren wurden die Sphäroplasten mit 30.000 g 30 min bei 4°C zentrifugiert, wobei der lösliche periplasmatische Extrakt als Überstand und die Sphäroplasten mit dem unlöslichen periplasmatischen Material als Pellet erhalten wurden. Der Kulturüberstand und der lösliche periplasmatische Extrakt wurden vereinigt, durch weitere Zentrifugation (30.000 g, 4°C, 40 min) geklärt. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung (Endkonzentration 70% Sättigung) eingeeengt. Das Proteinpräzipitat wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 4°C, 40 min) gewonnen und in 10% des Anfangsvolumens an 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0, aufgelöst. Eine immobilisierte Metallaffinitätschromatographie (IMAC) wurde bei 4°C unter Verwendung einer 5 ml Säule an chelatischer Sepharose (Pharmacia), die mit Cu²⁺ beladen war und mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,0 (Startpuffer) equilibriert worden war, durchgeführt. Die Probe wurde durch ihr Leiten über die Säule aufgeladen. Sie wurde dann mit zwanzig Säulenvolumina Startpuffer, gefolgt von Startpuffer mit 50 mM Imidazol, bis die Absorption bei 280 nm des Effluents minimal war, gewaschen (etwa dreißig Säulenvolumina). Das absorbierte Material wurde mit 50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 250 mM Imidazol, pH 7,0, eluiert.

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Bradford-Farbstoffbindungstest (1976, Anal. Biochem., 72, 248–254) unter Verwendung des Bio-Rad (München, Deutschland)-Proteinassaykits bestimmt. Die Konzentrationen der gereinigten tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden aus den A₂₈₀-Werten unter Verwendung der Extinktionskoeffizienten ε^{1mg/ml} = 1,96 bzw. 1,93 bestimmt.

Beispiel 4

Expression des tetravalenten bzw. bivalenten Antikörper-Konstruktes in der Hefe *Pichia pastoris*

Kompetente *P. pastoris* GS155-Zellen (Invitrogen) wurden in Gegenwart von 10 pg Plasmid-DNA von pPIC-DISC-LL bzw. pPIC-DISC-SL, die mit SacI linearisiert worden war, elektroporiert. Die Transformanten wurden 3 Tage bei 30°C auf YPD-Platten, die 100 pg/ml Zeocin™

enthielten, selektiert. Die Klone, die bivalente bzw. tetravalente F_v-Antikörper-Konstrukte sezernierten, wurden durch Plattenscreening unter Verwendung eines anti-c-myc-mAk 9E10 (IC Chemikalien, Ismaning, Deutschland) selektiert. Zur Expression der bivalenten bzw. tetravalenten F_v-Antikörper-Konstrukte wurden die Klone in YPD-Medium in Schüttelkolben 2 Tage bei 30°C unter Rühren gezüchtet. Die Zellen wurden zentrifugiert, in dem gleichen Volumen des Mediums, das Methanol enthielt, resuspendiert und weitere 3 Tage bei 30°C unter Rühren inkubiert. Die Überstände

wurden nach der Zentrifugation gewonnen. Das rekombinante Produkt wurde durch Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von IMAC, wie vorstehend beschrieben, isoliert.

Beispiel 5

Charakterisierung des tetravalenten bzw. bivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes

(A) Größenausschlußchromatographie

Eine analytische Gelfiltration der F_v-Antikörper-Konstrukte wurde in PBS unter Verwendung einer Superdex-200-HR10/30-Säule (Pharmacia) durchgeführt. Das Probenvolumen und die Fließgeschwindigkeit betrugen 200 µl/min bzw. 0,5 ml/min. Die Säule wurde mit hoch- und niedermolekularen Gelfiltrations-Kalibrationskits (Pharmacia) kalibriert.

(B) Durchflußzytometrie

Die menschliche CD3⁺/CD19⁻-akute-T-Zell-Leukämie Jurkat und die CD19⁺/CD3⁻-B-Zelllinie JOK-1 wurden für die Durchflußzytometrie verwendet. 5 × 10⁵ Zellen in 50 µl RPMI 1640-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein, Deutschland), das mit 10% FCS und 0,1% Natriumazid supplementiert war (als vollständiges Medium bezeichnet), wurden mit 100 µl der F_v-Antikörper-Präparate 45 min auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit dem vollständigen Medium wurden die Zellen mit 100 µl 10 µg/ml anti-c-myc-Mak 9E10 (IC Chemikalien) in dem gleichen Puffer 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Waschzyklus wurden die Zellen mit 100 µl des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-IgG (GIBCO BRL) unter den gleichen Bedingungen wie vorher inkubiert. Die Zellen wurden dann erneut gewaschen und in 100 µl 1 µg/ml-Propidiumiodid-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in vollständigem Medium unter Ausschluß von toten Zellen resuspendiert. Die relative Fluoreszenz der gefärbten Zellen wurde unter Verwendung eines FACScan-Durchflußzytometers (Becton Dickinson, Mountain View, CA) gemessen.

(C) Cytotoxizitätstest

Die CD19-exprimierende Burkitt-Lymphoma-Zelllinie Raji und Namalwa wurden als Zielzellen verwendet. Die Zellen wurden in RPMI 1640 (GIBCO BRL), das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS (GIBCO BRL), 2 mM Glutamin und

1 mM Pyruvat supplementiert war, bei 37°C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 7,5% CO₂ inkubiert. Die cytotoxischen T-Zell-Tests wurden in RPMI-1640-Medium, das mit 10% FCS, 10 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 1 mM Pyruvat und 0,05 mM 2-ME supplementiert war, durchgeführt. Die cytotoxische Aktivität wurde unter Verwendung eines Standard [⁵¹Cr]-Freisetzungstests bewertet; 2 × 10⁶ Zielzellen wurden mit 200 µCi Na [⁵¹Cr]O₄ (Amersham-Buchler, Braunschweig, Deutschland) markiert und 4mal gewaschen und anschließend in Medium in einer Konzentration von 2 × 10⁵/ml resuspendiert. Die Effektorzellen wurden auf eine Konzentration von 5 × 10⁶/ml eingestellt. Zunehmende Mengen an CTLs in 100 µl wurden auf 104 Zielzellen/Vertiefung in 50 µl titriert. 50 µl Antikörper wurden jeder Vertiefung zugesetzt. Der gesamte Test wurde dreifach ange-setzt und 4 h bei 37°C inkubiert. 100 µl des Überstands wurden gewonnen und auf [⁵¹Cr]-Freisetzung in einem gamma-Zähler (Cobra Auto Gamma; Canberra Packard, Dreieich, Deutschland) getestet. Die maximale Freisetzung wurde durch Inkubation der Zielzellen in 10% SDS bestimmt, und die spontane Freisetzung wurde durch Inkubation der Zellen in Medium allein bestimmt. Die spezifische Lyse (%) wurde berechnet als: (experimentelle Freisetzung – spontane Freisetzung)/(– maximale Freisetzung – spontane Freisetzung) × 100.

Patentansprüche

1. Multivalentes F_v-Antikörper-Konstrukt mit mindestens vier variablen Domänen, die über die Peptidlinker 1, 2 und 3 miteinander verbunden sind.
2. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 1, wobei die Peptidlinker 1 und 3 0–10 Aminosäuren aufweisen.
3. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 2, wobei die Peptidlinker 1 und 3 die Aminosäuresequenz GG aufweisen.
4. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bivalent ist.
5. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4, wobei der Peptidlinker 2 11–20 Aminosäuren aufweist.
6. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz (G₄S)₄ aufweist.
7. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–3, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt tetravalent ist.
8. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7, wobei der Peptidlinker 2 3–10 Aminosäuren aufweist.
9. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 7 oder 8, wobei der Peptidlinker 2 die Aminosäuresequenz GGPGS aufweist.
10. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt multispezifisch ist.
11. F_v-Antikörper-Konstrukt nach Anspruch 10, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt bispezifisch ist.
12. F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1–9, wobei das F_v-Antikörper-Konstrukt monospezifisch ist.
13. Verfahren zur Herstellung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1–12, wobei für die Peptidlinker 1, 2 und 3 kodierende DNAs mit für die vier variablen Domänen eines F_v-Antikörper-Konstruktes kodierenden DNAs ligiert werden derart, daß die Peptidlinker die variablen Domänen miteinander verbinden, und das erhaltene DNA-Molekül in einem Expressionsplasmid exprimiert wird.

14. Expressionsplasmid, kodierend für das multivalente F_v-Antikörper-Konstrukt nach einem der Ansprüche 1-12.
15. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-LL. 5
16. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pDISC3 × 19-SL.
17. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-LL.
18. Expressionsplasmid nach Anspruch 14, nämlich pPIC-DISC-SL. 10
19. Verwendung des multivalenten F_v-Antikörper-Konstruktes nach einem der Ansprüche 1-12 zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen.
20. Verwendung nach Anspruch 19, wobei die Erkrankungen virale, bakterielle oder Tumor-Erkrankungen sind. 15

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

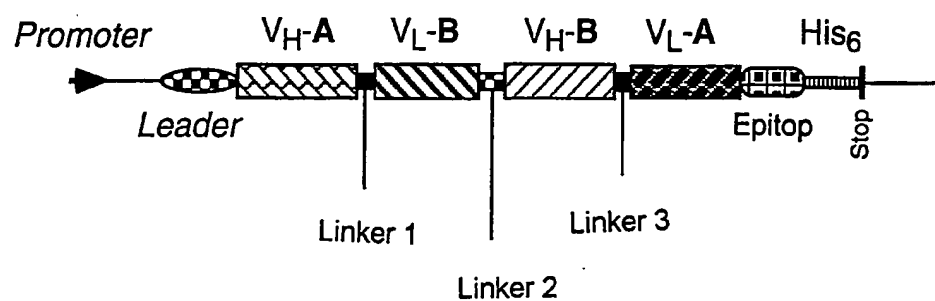
50

55

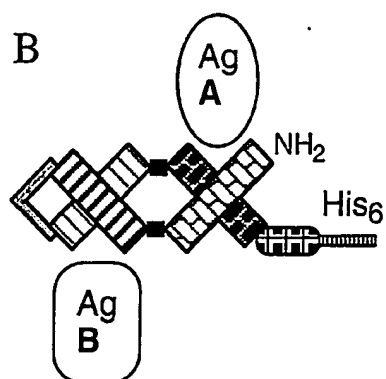
60

65

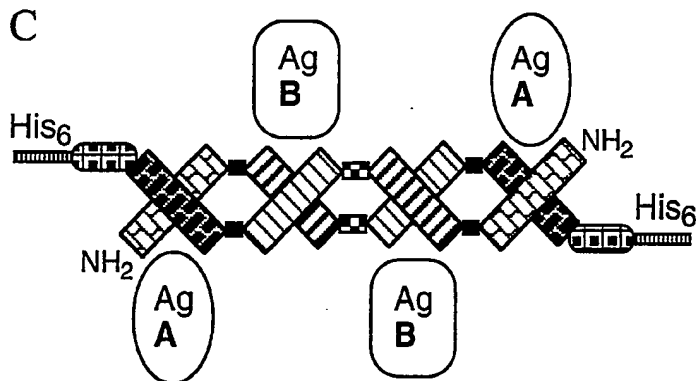
A



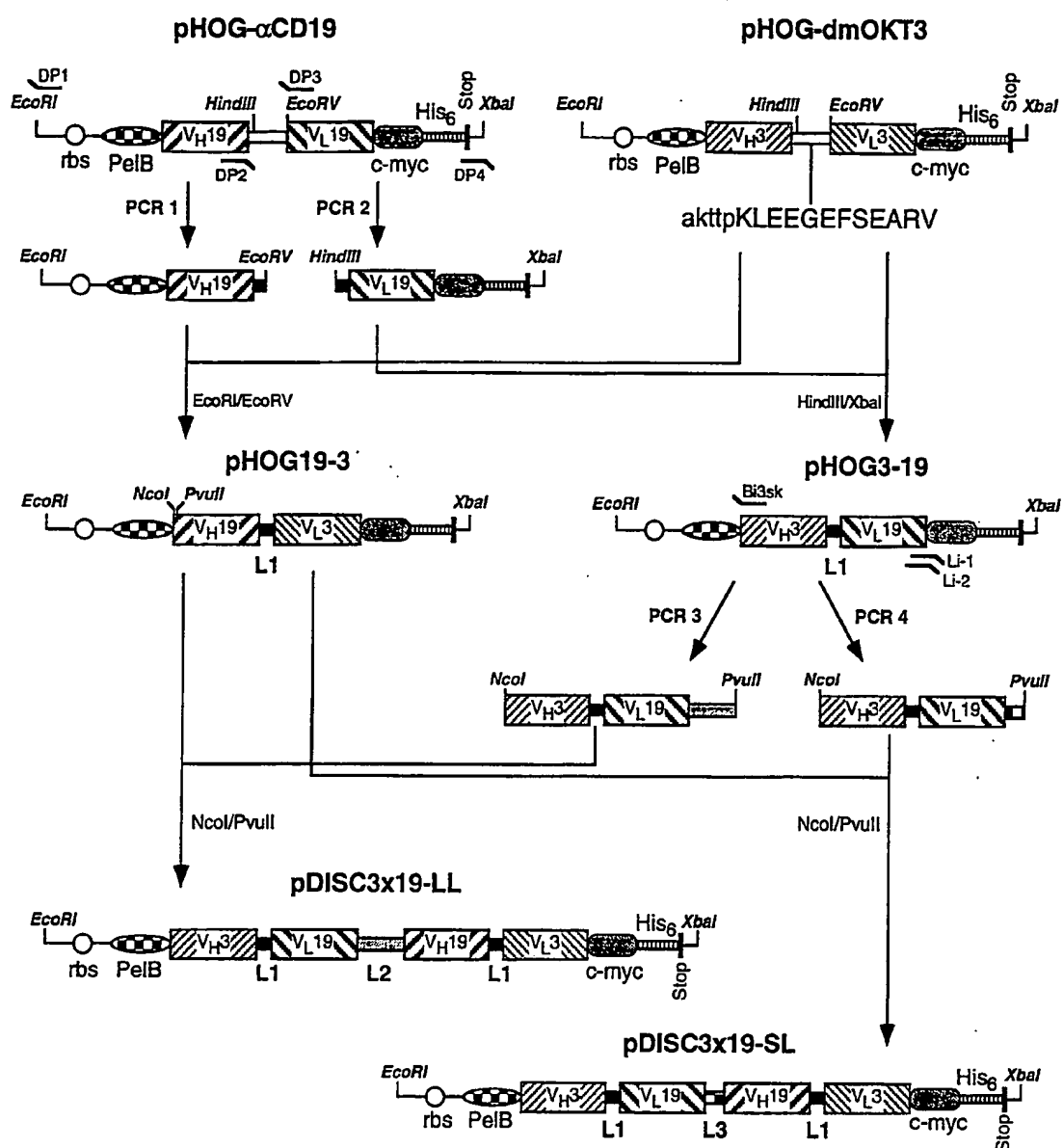
B



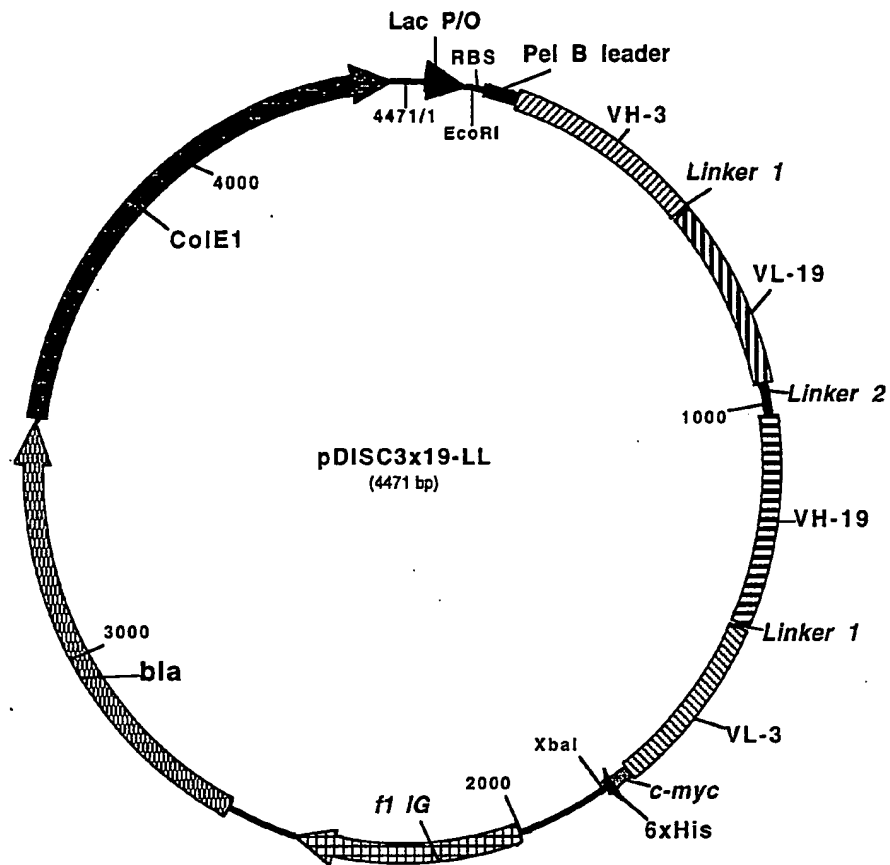
C



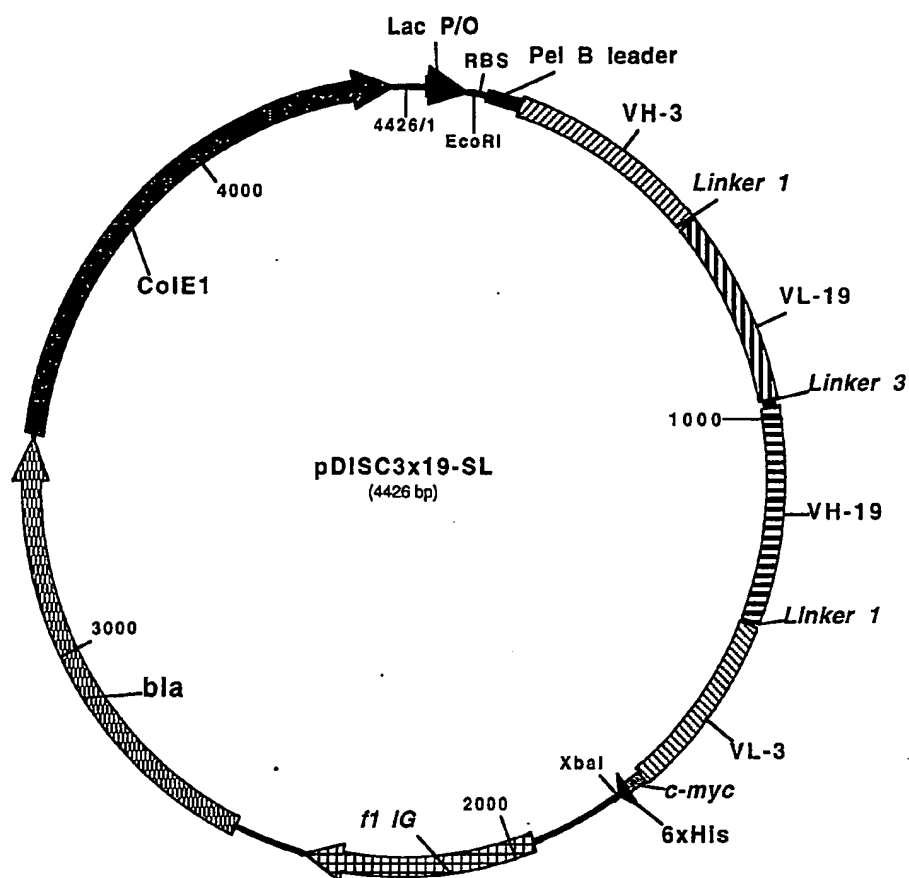
FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3



FIGUR 4

EcoRI RBS PelB leader NcoI
 1 GAATTCATTAAGCAGGAGAAATTAACCATGAATPACCTATTGCTTACGGCAGCGCTGGCTTGCTGCTGCGCAGCTCAGCGCGCATGG
 1► M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M
 * Frame-H1 VH anti-CD3
 92 CGCAGGTGCACTGCAGCAGCTCTGGGGCTGAACCTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
 22► A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 183 TAGGTACACGATGCAGCTGGGTAAACACAGAGGCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGCTGGTTATAC
 52► R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T
 Frame-H3
 267 TAATTACAATCAGAAGTTCAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCTCTCCAGCACAGCTACATGCAACTGAGCAGCGTAC
 80► N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T
 CDR-H3 Frame-H4
 354 ATCTGAGGACTCTGCAGCTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTTACAGCCTTGACTACTGGGGCCCAAGGCAACACTCTCA
 109► S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T L
 CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19
 440 CAGTCTCTCAGCCAAACACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTACCCCAAATCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGCGAGA
 138► T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q
 CDR-L1 Frame-L2
 530 GGGCCACCATCTCTGCAAGGCCAGCCAAAGTGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
 168► R A T I S C K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G
 CDR-L2 Frame-L3
 614 AGCCACCCAAACTCTCATCTATGATGATCCAACTCTAGTTTCTGGGATCCCAACCAGGTTTAGTGGCAGTGGGCTGGGACAGACTT
 196► Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F S G S G S G T D F
 CDR-L3 Frame-L4
 702 CACCCCTCAACATCCATCCTGTGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGACGAAAGTACTGAGGATCCCGTGACGTTCCGTGGA
 225► T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G
 C kappa NotI Linker 2
 790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAACCGCGTCATGCTGCGCGCTGGTGGTGGTGGTCTGGCGCGGTGGTAGCGGTGGTGGCGGG
 255► G T K L E I K R A D A A A G G G G S G G G S G G G G
 PvuII Frame-H1 VH anti-CD19
 874 TCCGGTGGTGGTGGTAGCCAGGTGCACTGCAAGCTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGTCCCTCAGTGAAGATTCTCTCAAGG
 283► S G G G G S Q V Q L Q Q S G A E L V R P G S S V K I S C K
 CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2
 962 CTCTGCTATGCATTAGTCTAGCTACTGGATGAACCTGGGGAAGCAGAGGCTGGACAGGCTTGTAGTGGATTGGACAGATTGGCC
 312► A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R P G Q G L E W I G Q I W
 PstI Frame-H3
 1049 CTGGAGATGGTGATACTAACTACAATGGAAGATTCAAGGGTAAAGCCACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCAGACGCTACA
 341► P G D G D T N Y N G K F K G K A T L T A D E S S S T A Y
 CDR-H3
 1133 TGCAACTCAGCAGCTAGCATCTGAGGACTCTGCGCTCTATTCTGTGCAAGACGGGAGACTAGCAGCGTAGGCCGTTATTACTAT
 369► M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R R E T T T V G R Y Y Y
 Frame-H4 CH1 Linker 1 Frame-L1
 1219 GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTCAGCCAAACACACCCCAAGCTTGGCGGTGATATCGTGCTCACTC
 398► A M D Y W G Q G T S V T V S S A K T T P K L G G D I V L T
 VL anti-CD3 CDR-L1
 1307 AGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGTCAACATGACCTGCAAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACTGG
 427► Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S Y M N W
 Frame-L2 CDR-L2 Frame-L3
 1393 TACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCCAAAGATGGATTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA
 456► Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G
 CDR-L3
 1481 GTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAA
 485► S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A T Y Y C Q Q W S S N
 Frame-L4 C kappa c-myc epitope
 1569 CCCATTACCGTTCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATCTGACCAACTGGATCCGAACAAAGCTGATCTCAG
 514► P F T F G S G T K L E I N R A D T A P T G S E Q K L I S
 His6 tail XbaI
 1655 AAGAAGACCTAAACTCACATCCATCACCATCACTAATCTAGA
 543► E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 5

EcoRI RBS PstI leader NcoI

1 GAATTCATTAAAGGAGGAATAATTAACCATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCGCGTGGCTTGCTGCTGCTGGCAGCTCAGCGGGCCATGG
1> M K Y L L P T A A A G L L L A A Q P A M

* Frame-H1 VH anti-CD3

92 CGCAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTAC
22> A Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T

CDR-H1 Frame-H2 CDR-H2

183 TAGGTACACGATGCACCTGGGTAACAACAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGCAATACCTTAGCCGTGGTTATAC
52> R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y T

Frame-H3

267 TAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCACAGCTACATGCAACTGAGCAGCGCTGAC
80> N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S S T A Y M Q L S S L T

CDR-H3 Frame-H4

354 ATCTGAGEACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATATTATGATGATCATTACAGCCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCCTCTCA
109> S E D S A V Y Y C' A R Y Y D D H Y S L D Y W G Q G T T L

CH1 Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD19

440 CAGTCTCTCTCAGCCBAACAACACCAAGCTTGGCGGTGATATCTTGCTCACCCAACTCCAGCTTCITTTGGCTGTGTCTCTAGGCGCAGA
138> T V S S A K T T P K L G G D I L L T Q T P A S L A V S L G Q

CDR-L1 Frame-L2

530 GGGCCACCCTCTCTCTGCAAGGCCACCAAAGTGTGATTATGATGGTGATAGTTATTTTGAACTGGTACCAACAGATTCCAGGAC
168> R A T I S C . K A S Q S V D Y D G D S Y L N W Y Q Q I P G

CDR-L2 Frame-L3

614 AGCCACCCAACTCTCATCTATGATGCATCCAACTCTAGTTCTGGGATCCACCCAGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTT
196> Q P P K L L I Y D A S N L V S G I P P R F T S G S G S G T D F

CDR-L3 Frame-L4

702 CACCCTCAACATCCATCTCTGGGAGAAGGTGGATGCTGCAACCTATCACTGTGAGCAAGTACTGAGGATCGGTGGACGTTGGGTGGA
225> T L N I H P V E K V D A A T Y H C Q Q S T E D P W T F G G

C kappa NotI Linker 3 PvuII Frame-H1

790 GGCACCAAGCTGGAATCAAAAGGGCTGATGCTGCGGCGCTGGTGGCCCCAGGTCTGCAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCT
255> G T K L E I K R A D A A A A G G P G S Q V Q L Q Q S G A E L

VH anti-CD19 CDR-H1 Frame-H2

879 GGTGAGGCTGGGTCTCAGTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATGCATTCACTAGCTACTGGATGAACCTGGTGAAGCAGAGGC
284> V R P G S S V K I S C . K A S G Y A F S S Y W M N W V K Q R

CDR-H2

968 CTGGACAGGGTCTTGAGTGGATTGACAGATTGCGGCTGGAGATGGTGATACTAATACATAATGGAAAGTTCAAGGGTAAAGCC
314> P G Q G L E W I G Q I W P G D G D T N Y N G K F K G K A

Frame-H3

1051 ACTCTGACTGCAGACGAATCTCCAGCAGAGCTACATGCAACTCAGCAGCTAGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTCTGCAAGAC
342> T L T A D E S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y F C A R

CDR-H3 Frame-H4 CH1

1142 GGGAGACTACGACGGTAGGCGGTTATTACTATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACTCAGTCACCGTCTCTCTCAGCCBAAA
372> R E T T T V G R Y Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S A K

Linker 1 Frame-L1 VL anti-CD3

1226 CAACACCCAGCTTGGCGGTGATATCTGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTACCATGACCTGCA
400> T T P K L G G D I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C

CDR-L1 Frame-L2 CDR-L2

1316 GTGGCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGAACCTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAAGATGGATTATGACACATCCAA
430> S A S S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K

Frame-L3

1401 ACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCGAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCGCATGGAGGCTGAAGATGC
458> L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A

CDR-L3 Frame-L4 C kappa

1491 TGCCACTTATTACTGCCAGCTGGAGTAGTAACCCATTACAGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAACCGGGCTGATCTAGC
488> A T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R A D T A

c-myc epitope His6 tail XbaI

1578 ACCAACTGGATCCGAACAAAAGCTGATCTCAGAAGAAGACCTTAAACTCACATCACCATCACCATCAATCTAGA
517> P T G S E . Q K L I S E E D L N S H H H H H H .

FIGUR 6

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCAGGTTGCAACTGCAGCAGTC
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F Q V Q L Q Q S

VH anti-CD3

1234 TGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
98▶ G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 7

941 ATGAGATTTCCTTCAATTTTACTGCTGTTTTATTTCGCAGCATCCTCOGCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTAC
1▶ M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T

alpha-factor signal

1015 AACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATG
25▶ T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D

BsrDI

1089 TTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTTGCT
50▶ V A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A

XhoI

EcoRI

1163 GCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGAATTCATGGCGCAGGTGCAACTGCAG
75▶ A K E E G V S L E K R E A E A E F M A Q V Q L Q

VH anti-CD3

1235 CAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCT
99▶ Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S

FIGUR 8